ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ՀԱՆՐԱՊԵՏՈՒԹՅԱՆ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
ՄՈԼԵԿՈՒԼԱՅԻՆ ԿԵՆՍԱԲԱՆՈՒԹՅԱՆ ԻՆՍՏԻՏՈՒՏ

ԽԱՉԱՏՐՅԱՆ ՆԱՐԻՆԵ ԽԱՉԻԿԻ

# ԱՌՆԵՏԻ ԳԼԽՈՒՂԵՂՈՒՄ ԵՎ ԵՆԹԱՍՏԱՄՈՔՍԱՅԻՆ ԳԵՂՁՈՒՄ ՆՅԱՐԴԱԱԿՏԻՎ ԱՄԻՆԱԹԹՈՒՆԵՐԻ ՔԱՆԱԿԱԿԱՆ ՓՈՓՈԽՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԸ ՆՈՐՄԱՅՈՒՄ ՈՒ ՓՈՐՁԱՐԱՐԱԿԱՆ ՇԱՔԱՐԱԽՏԻ ԴԵՊՔՈՒՄ

Գ.00.04 – «Կենսաքիմիա» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ – 2021

---

НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ

ХАЧАТРЯН НАРИНЕ ХАЧИКОВНА

# КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МОЗГУ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук по специальности
03.00.04 – «Биохимия»

ЕРЕВАН - 2021

Ատենախոսության թեման հաստատվել է ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդում

Գիտական ղեկավար՝ կ.գ.դ., պրոֆ. Ռոմիկ Գուրգենի Քամալյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ կ.գ.դ., պրոֆ. Մաքսիմ Արշալույսի Սիմոնյան
կ.գ.թ. Քրիստինե Էդգարի Դանիելյան

Առաջատար կազմակերպություն՝ Երևանի պետական համալսարան

Ատենախոսության պաշտպանությունը տեղի կունենա 2021 թ. ապրիլի 16-ին, ժամը $14^{00}$-ին ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտում, 042 մասնագիտական խորհրդի նիստում (ՀՀ, Երևան 0014, Հասրաթյան 7):

Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ՀՀ ԳԱԱ Մոլեկուլային կենսաբանության ինստիտուտի գրադարանում և http://molbiol.sci.am կայքում:

Սեղմագիրն առաքվել է 2021 թ. մարտի 5-ին:

042 մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար
կենս. գիտ. թեկնածու Գ.Մ. Մկրտչյան

---

Тема диссертации утверждена на заседании ученого совета Института биохимии имени Г. Бунятяна НАН РА

Научный руководитель: д.б.н.,проф. Камалян Ромик Гургенович

Официальные оппоненты: д.б.н., проф. Симонян Максим Аршалуйсович
к.б.н. Даниелян Кристине Эдгаровна

Ведущая организация: Ереванский государственный университет

Защита диссертации состоится 16 апреля 2021 г. в $14^{00}$ часов на заседании специализированного совета 042, в Институте молекулярной биологии НАН РА (РА, 0014, г. Ереван, ул. Асратяна 7).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии НАН РА и на сайте http://molbiol.sci.am.

Автореферат разослан 5 марта 2021 г.

Ученый секретарь специализированного совета 042
кандидат биол. наук Мкртчян Г.М.

## ԱՇԽԱՏԱՆՔԻ ԸՆԴՀԱՆՈՒՐ ԲՆՈՒԹԱԳԻՐԸ

**Աշխատանքի արդիականությունը**: Նյարդաակտիվ ամինաթթուները մեծ դեր են խաղում կաթնասունների օրգանիզմում: Դրանք քանակապես գերակշռություն ունեն այլ ամինաթթուների նկատմամբ ոչ միայն ուղեղում այլ և ծայրամասային օրգաններում: Այս ամինաթթուների շարքին են պատկանում երկկարբոն ամինաթթուները և ԳԱԿԹ-ն, որոնք կարող են առաջանալ գլյուկոզի և ճարպաթթուների օքսիդացման ընթացքում, Կրեբսի ցիկլում առաջացող կետոթթուների ռեամինացման կամ այլ ճյուղավորված ամինաթթուների տրանսամինացման ճանապարհով: Դրանց հիմնական աղբյուր են հանդիսանում ամիդները, հատկապես գլուտամինը: Վերջինս հանգուցային դեր ունի ամինախմբերի փոխադրման, մատակարարման և հեռացման գործընթացներում: Երկկարբոն ամինաթթուները և դրանց ամիդները կենտրոնական դեր են խաղում ազոտի և էներգիայի փոխարկման պրոցեսներում, դրանք ներարող սպիտակուցների կոնֆորմացիոն ձևափոխումներում, և բնությունը դրանց ընտրել է որպես նյարդային միջնորդներ:

Հանդիսանալով նյարդափոխադրիչ ամինաթթուների աղբյուր՝ գլուտամինը միաժամանակ գլյուկոզի պակասի դեպքում բջիջներն ապահովում է էներգիայով: Ընդ որում դա տեղի է ունենում ոչ միայն նյարդային, այլև այլ բջիջներում, հատկապես էնտերոցիտներում, ենթաստամոքսային գեղձի և իմունային համակարգի բջիջներում: Պետք է ընդգծել, որ գլուտամինի ընտանիքի ամինաթթուների մետաբոլիզմում և ազդակային պրոցեսներում մասնակցության տեսանկյունից նշված բջիջները և նեյրոնները ընդհանրություն ունեն: Ենթաստամոքսային գեղձի բջիջները, ինչպես և նեյրոնները, պարունակում են հիմնականում միտոքոնդրիոմների ներքին թաղանթի արտաքին պատին տեղաբաշխված ֆոսֆատակտիվացվող գլուտամինազ ֆերմենտը:

Հետաքրքիր է, որ նեյրոնների և ենթաստամոքսային գեղձի β-բջիջների ՖԱԳ-երը նման են իրենց կինետիկական և կարգավորիչ հատկություններով և տարբերվում են լյարդի ֆերմենտից: Բացի այդ β-բջիջների պլազմատիկ թաղանթը կրում է գլուտամինաթթվի և ԳԱԿԹ-ի ռեցեպտորներ, որոնք մասնակցում են դրանց ազդակային ակտիվության կարգավորման գործընթացներում:

Նյարդաակտիվ ամինաթթուների համակարգը, դրանց առաջացման և յուրացման ուղիները, այն իրականացնող ֆերմենտները, ազդակների մշակումը և ներբջջային համապատասխան էֆեկտոր կառույցներին փոխանցումը իրականացնող ռեցեպտորները լայնորեն ուսումնասիրված են, սակայն, ուղեղի նյութափոխանակային համակարգի ուսումնասիրության անհրաժեշտությունը չի նվազում: Հայտնաբերվում են նոր նյութափոխանակային ուղիներ և գործառույթներ: Այսպես, մեր լաբորատորիայում Ռ. Քամալյանի [Камалян и др. 2012] կողմից հայտնաբերվել է գլուտամինից ԳԱԿԹ-ի առաջացման նոր ուղի՝ գլուտամինի ուղղակի դեկարբօքսիլացում, որն ուղեկցվում է ԳԱԿԹ-ամիդի առաջացմամբ և շրջանցում է էկսիտոտոքսիկ գլուտամինաթթվի առաջացումը: Ի տարբերություն ԳԱԿԹ-ի, ԳԱԿԹ-ամիդը հաղթահարում է արյուն-ուղեղային պատնեշը և ներորովայնային ներարկումից հետո ուղեղում ցուցաբերում է ԳԱԿԹ-ի ազդեցությունը: Հետաքրքիր է, որ այդ նոր ուղին ակտիվանում է ուղեղի նյարդատոքսիկ խանգարումների ժամանակ:

Բացառված չեն նաև համակարգի բաղադրիչների այլ նյութափոխանակային ուղիներ, որոնք կարող են ունենալ հատուկ նշանակություն: Այդ առումով երկկարբոն ամինաթթուների ամիդների փոխարկումները հետաքրքիր են, քանի որ կարող են փոփոխել ինչպես նյարդաակտիվ ամինաթթուների համակարգի բաղադրիչների փոխ-հարաբերությունները, այնպես էլ դրանցով պայմանավորված պրոցեսները:

Վերջին տարիներին մեծ ուշադրություն է տրվում նյարդաակտիվ ամինաթթուների ֆունկցիաների ուսումնասիրմանը ոչ միայն ուղեղում, այլև իմունային համակարգում և ենթաստամոքսային գեղձում: Ցույց է տրվել ԳԹ-ի, ԳՆ-ի և ԳԱԿԹ-ի բարձր քանակների առկայությունը ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակներում, ինսուլինի սինթեզի և արտազատման վրա անմիջական ազդեցությունը, գլյուկագոն և սոմատոստատին արտադրող կղզյակների α- և δ-բջիջների արգելակումը: Մի շարք գիտնականներ արդարացված են համարում շաքարախտի բուժման համար ԳԱԿԹ-ի օգտագործումը, քանի որ ԳԱԿԹ-ը ապահովում է երկարատև նորմոգլիկեմիա, ինչը պայմանավորված է դրա միաժամանակյա հակաբորբոքային, Т-բջիջների կարգավորիչ պատասխանների ակտիվացման և β-բջիջների ռեպլիկացիայի վրա խթանիչ ազդեցությամբ:

**Աշխատանքի նպատակն ու խնդիրները**

Աշխատանքի նպատակն է՝

1. Համեմատել նյարդաակտիվ ամինաթթուների նյութափոխանակության որոշ գործընթացները ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում նորմայում;
2. Ուսումնասիրել շաքարախտի փորձարարական մոդելներում հիպերգլիկեմիայի վրա ԳԱԿԹ-գեներացնող գլուտամինի (ԳՆ) և էթանոլամին-O-սուլֆատի (ԷՕՍ) ազդեցությունը:

Այդ նպատակին հասնելու համար մեր առաջ դրվել են հետևյալ խնդիրները՝

1. Ուսումնասիրել ասպարագինի, որպես գլուտամինի հնարավոր աղբյուր, յուրացումը գլխուղեղի և ենթաստամոքսային գեղձի հոմոգենատներում և միտոքոնդրիալ ֆրակցիաներում:
2. Ուսումնասիրել գլուտամինի յուրացումը ենթաստամոքսային գեղձի հոմոգենատում և միտոքնդրիալ ֆրակցիայում:
3. Ուսումնասիրել ստրեպտոզոտոցինով ինդուկցված շաքարախտի փորձարարական մոդելում գլուտամինի և ԷՕՍ-ի ազդեցությունը արյան գլյուկոզի և նյարդակտիվ ամինաթթուների մակարդակների վրա՝ ուղեղում, ենթաստամոքսային գեղձում և լյարդում:
4. Ուսումնասիրել ալոքսանով ինդուկցված շաքարախտի փորձարարական մոդելում ԷՕՍ-ի ազդեցությունը արյան գլյուկոզի և նյարդակտիվ ամինաթթուների մակարդակների վրա՝ ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում:
5. Ուսումնասիրել β-բջիջների կուլտուրայում ստրեպտոզոտոցինի և ԳԱԿԹ գեներացնող գործոնների ազդեցությունը ինսուլինի արտադրման վրա:

**Աշխատանքի գիտական նորույթը**: Աշխատանքում ցույց է տրված, որ ուղեղի հոմոգենատում ասպարագինի ինկուբացիան բերում է ասպարագինաթթվի (ԱԹ), գլուտամինաթթվի (ԳԹ) և գլուտամինի (ԳՆ) առաջացմանը: α-կետոգլուտարաթթուն (α-ԿԳ) նպաստում է նշված ամինաթթուների առաջացմանը և ճնշում է ավելացված ԳԹ-ի յուրացումը ԱԵՖ-ի առկայության և բացակայության պայմաններում: Նման արգելակում դիտվում է նաև ուղեղի միտոքոնդրիումներում: Ասպարագինը (ԱՆ) նպաստում է ԳԹ-ի յուրացմանը ամոնիակի առաջացումով: ԱԵՖ-ը և ՆԱԴ-ը նպաստում են ԳԹ-ի յուրացմանը միտքոնդրիումներում: ԱԵՖ-ը բարձրացնում է ԱԹ-ի, ԳՆ-ի ու ամոնիակի ելքը էնդոգեն գլուտամինաթթվից, իսկ ՆԱԴ-ը միայն ամոնիակի առաջացումը: α-ԿԳ-ն շեղում է ամինաթթուների նյութափոխանակությունը դեպի գլուտամինաթթվի սինթեզը: Էնդոգեն և էկզոգեն α-ԿԳ-ն արդյունավետ յուրացվում է ուղեղի միտոքոնդրիումներում, հատկապես ԱԵՖ-ի և պիրիդոքսալֆոսֆատի (ՊՖ) առկայությամբ:

Հետազոտությունները ցույց են տվել, որ ենթաստամոքսային գեղձի միտոքոնդրիումներում առկա է ֆոսֆատակտիվացվող գլուտամինազ (ՖԱԳ), որն ակտիվանում է ԱԵՖ-ով և α-ԿԳ-ով: Ենթաստամոքսային գեղձի հոմոգենատում ԱԵՖ-ի կամ α-ԿԳ-ի առկայության պայմաններում բարձրանում է գլուտամինի մակարդակը:

Ստացված տվյալները վկայում են ներբջջային կառույցներում նյարդափոխադրիչ ամինաթթուների ներգրավման և բարդ ինքնափոխարկման մասին, որոնք ընկած են դրանց նյարդափոխադրիչ, էներգետիկ և պլաստիկ ֆունկցիաների հիմքում:

Ցույց է տրվել, որ առնետների ենթաստամոքսային գեղձի և ուղեղի նյարդաակտիվ ամինաթթուների մակարդակները համեմատելի են: Առնետի ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում ուսումնասիրվել է ԳԱԿԹ-տրանսամինազի արգելակիչ՝ ԷՕՍ-ի, ԳԹ-ի ու ԳԱԿԹ-ի նախորդ՝ ԳՆ-ի անջատ և միասնական ազդեցությունը գլուտամինի ընտանիքի ամինաթթուների մակարդակների վրա: Հաստատվել է ԳԱԿԹ-ի մակարդակի վրա միասնական ազդեցության ավելի արդյունավետ լինելը:

Ստրեպտոզոտոցինը հավաստիորեն իջեցնում է ԳՆ-ի, ԳԹ-ի, ԳԱԿԹ-ի մակարդակը ենթաստամոքսային գեղձում: Բացահայտվել է ստրեպտոզոտոցինով ինդուկցված փորձարարական շաքարախտի ժամանակ ԳՆ-ի և ԷՕՍ-ի միաժամանակյա ներարկման պաշտպանիչ ազդեցությունը ամինաթթուների մակարդակի վրա առնետի ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում:

Մկների ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակային β-բջիջների կուլտուրայում ցույց է տրվել ԳԱԿԹ-ի և ԷՕՍ-ի ինսուլին-պաշտպանիչ ազդեցությունը:

Շաքարախտի ժամանակ ԳԱԿԹ գեներացնող միացությունները կարող են էական լինել ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակային β-բջիջների պահպանման, ինսուլինի սինթեզի և արտազատման համար: Գլուտամինը բարելավում է շաքարախտի նկատմամբ զգայուն աղիքային էպիթելիալ և իմունային բջիջների աշխատանքը, որի արդյունք՝ ԳԱԿԹ-ն անմիջականորեն ազդում է և իմունային բջիջների ակտիվության, և ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակային բջիջների սինթետիկ և ներզատիչ ֆունկցիաների վրա:

**Գիտակիրառական նշանակությունը**: Ստացված արդյունքները ընդլայնում են պատկերացումները շաքարախտի պաթոգենեզի վերաբերյալ և առաջարկում են նոր մոտեցումներ այդ հիվանդության բուժման համար:

Շաքարախտի ժամանակ ԳԱԿԹ գեներացնող միացությունները կարող են էական դեր խաղալ ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակային β-բջիջների պահպանման, ինսուլինի սինթեզի և արտազատման համար: Հաշվի առնելով ԳԱԿԹ-ի կարգավորիչ դերը ինսուլինի սինթեզում և սեկրեցիայում, գլուտամինի և ԷՕՍ-ի միասնական օգտագործումը կարող է էական լինել շաքարախտի բուժման հարցում: Ուստի շաքարատի բուժման նպատակով գերադասելի է օգտագործել գլուտամինը, որը հաղթահարում է արյուն-ուղեղային պատնեշը և ուղեղում փոխարկվում արյան գյուկոզը կարգավորող և կենտրոնական ԳԱԿԹ-էրգիկ մեխանիզմները խթանող ԳԱԿԹ-ի:

**Ատենախոսության նախնական փորձարկումը**: Ատենախոսության նյութը և հիմնական բովանդակությունը ներկայացվել են գիտաժողովներում.

Инновационное Развитие и Востребованность Науки в Современном Казахстане, VI Международная научная конференция, Алмааты, 2012; AAB Young scientists Conference New aspects in molecular biotechnology and biochemistry.Yerevan, RA, June 27-28, 2013; " NEW TRENDS IN LIFE SCIENCE". Yerevan Armenia, 26-28 SEPTEMBER 2016; "THE PAST, PRESENT AND FUTURE OF BIOCHEMISTRY" INTERNATIONAL YOUNG SCIENTISTS CONFERENCE dedicated to the 110th anniversaty of H. Buniatian 2-3 November 2017, Yerevan; Международная конференция «Современные тенденции биохимии, радиационной и космической биологии: Великий Сисакян и занчение его исследований». Ереванский государственный университет, Российский центр науки и культуры в Ереване., 11-13 ноябрь 2019, ст.85-88; INTERNATIONAL ONLINE CONFERENCE DEDICATED TO THE 90TH ANNIVERSARY OF ACADEMICIAN ARMEN GALOYAN "NEUROBIOLOGY IN THE 21ST CENTURY", 16-17 December 2020 ARMENIA, YEREVAN. Քննարկվել են ՀՀ ԳԱԱ Հ. Բունիաթյանի անվան կենսաքիմիայի ինստիտուտի գիտական խորհրդի նիստերում, տարեկան հաշվետվություններում, Ադենիլային միացությունների նյութափոխանակության լաբորատորիայի սեմինարներում:

**Հրատարակված գիտական աշխատանքները**: Ատենախոսության աշխատանքի թեմայով հրատարակվել է 6 գիտական հոդված և 5 աշխատություն՝ միջազգային և տեղական գիտաժողովներում:

**Ատենախոսության ծավալը և կառուցվածքը**: Ատենախոսությունը շարադրված է տպագրական 108 էջի վրա, բաղկացած է հետևյալ բաժիններից՝ ներածություն, գրական ակնարկ, հետազոտության նյութեր և մեթոդներ, կատարած հետազոտության արդյունքներ և դրանց քննարկում, ամփոփում, եզրակացություններ և գրականության ցանկ: Աշխատանքը ներառում է 13 աղյուսակ և 4 նկար: Գրականության ցանկը ներառում է անգլերեն և ռուսերեն լեզուներով 272 անվանում:

## ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ՆՅՈՒԹԵՐԸ ԵՎ ՄԵԹՈԴՆԵՐԸ

Փորձերի ընթացքում օգտագործվել են հետևյալ Sigma-Aldrich (ԱՄՆ) ֆիրմայի նյութերը՝ ասպարագին, ասպարագինաթթու, գլուտամին, գլուտամինաթթու, պիրիդոքսալֆոսֆատ, γ-ամինակարագաթթու (ԳԱԿԹ), ադենոզին եռֆոսֆորական թթու՝ (ԱԵՖ), նիկոտինամիդադենինդինուկլեոտիդ՝ (ՆԱԴ), էթանոլամին-O-սուլֆատ, α-կետոգլուտարաթթու, ստրեպտոզոտոցին (US) և ալոքսան, Հենքսի բուֆեր, կոլագենազ, HBSS լուծույթ, տրիպսին: Առնետի ինսուլինի դեմ ծովային խոզուկներից ստացված առաջնային հակամարմիններ, ծովային խոզուկի IgG-ի դեմ սինթեզված երկրորդային ՖԻԹՑ-նշանադրված այծի հակամարմիններ գնվել են Neuromics ֆիրմայից: Էլեկտրաֆորեզի համար օգտագործվել է հատուկ FN-11 թուղթ (Գերմանիա): Այլ օգտագործած նյութերը եղել են հնարավոր բարձր որակի:

Հետազոտությունները կատարվել են 120-200գ. զանգվածով սպիտակ երկսեռ առնետների վրա: Կենդանիները պահվել են նորմալ սննդային պայմաններում, 12 ժամյա լուսային ռեժիմով, միջավայրի ջերմաստիճանը՝ 22-24°C: Փորձարարական շաքարախտի ուսումնասիրման համար առնետները բաժանվել են երեք խմբերի (5-6 կենդանի յուրաքանչյուր խմբում). 1. հսկիչ խումբ; 2. ստրեպտոզոտոցինով կամ ալոքսանով մակածված շաքարախտի փորձնական խմբեր; 3. նախօրոք երեք օր գլյուտամին և ԷՕՍ ներարկված՝ ստրեպտոզոտոցինով և երեք օր ԷՕՍ ներարկված՝ ալոքսանով մակածված շաքարախտի փորձնական խմբեր: Չորրորդ օրը երկրորդ և երրորդ խմբերի կենդանիներին ներարկվել է ստրեպտոզոտոցին կամ ալոքսան, որից մի քանի օր անց հիվանդացած (հիպերգլիկեմիա) կենդանիները գլխատվել են թույլ եթերային նարկոզի ազդեցության պայմաններում: Հետազոտության նյութեր են հանդիսացել առնետների գլխուղեղը, ենթաստամոքսային գեղձը և լյարդը: Հյուսվածքները հոմոգենիզացվել են 0.05Մ Tris-0.3Մ սախարոզային (pH 7.4) միջավայրում, հոմոգենատից միտոքոնդրիումները անջատվել են դիֆերենցիալ ցենտրիֆուգման մեթոդով: Ուղեղի միտոքոնդրիումները անջատվել են ըստ Բռոուդի և Բեյնի (Brody and Bain,1951) Պալադինի և Կիրսենկոյի (Палладин и Кирсенко, 1961) ձևափոխմամբ, ենթաստամոքսային գեղձի միտոքոնդրիումները ստացվել են համաձայն Հոդարնոյի և ուրիշների (Hodarnau et al., 1973): Ամինաթթուների բաժանումը իրականացվել է պիրիդին ացետատային բուֆերում, pH-3,9 բարձրավոլտ թղթային էլեկտրաֆորեզի մեթոդով (1 սմ թղթի վրա հաշված 1200 վոլտ լարման և 0,5 մԱ հոսանքի ուժի պայմաններում) (Камалян и др., 1966): Էլեկտրաֆորեզի տևողությունը եղել է 1,5-2 ժամ: Ամինաթթուները բացահայտվել են նինհիդրինով գունավորմամբ, ապա դրանց պղնձի սուլֆատ պարունակող սպիրտային լուծույթում էքստրակցված ամինաթթուների կլանումը չափվել է Specol-11-ով, 545 նմ ալիքի երկարությունում: Ամինաթթուների քանակական գնահատումը կատարվել է ըստ ստանդարտ կորերի, որոնք կառուցվել են նույն պայմաններում էլեկտրաֆորեզի ենթարկված ամինաթթուների արդյունքների հիման վրա:

Մկների ենթաստամոքսային գեղձի β-բջիջները անջատվել են Սկելինի և ուրիշների եղանակով [Skelin et al., 2010]: Միկրոսկոպիան իրականացվել է BM-800 [Boeco, Germany] ֆլյուորեսցենտային մանրադիտակի և թվային ֆոտոխցիկի PC1200

Canon միջոցով: Արդյունքների վիճակագրական վերլուծությունը կատարվել է Graph Pad InStat համակարգչային ծրագրի միջոցով: Տվյալները ներկայացվել են միջին ± ստանդարտ սխալի միջինը (M± SEM): Հավաստիության չափանիշը ընդունվել է $p < 0.05$:

## ՀԵՏԱԶՈՏՈՒԹՅԱՆ ԱՐԴՅՈՒՆՔՆԵՐԸ ԵՎ ՔՆՆԱՐԿՈՒՄԸ

Քանի որ ուղեղի բջիջները և ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակային բջիջները նմանվում են իրենց նյարդաակտիվ ամինաթթուների, դրանց նյութափոխանակության ֆերմենտների և ռեցեպտորների պարունակությամբ, հետաքրքրություն էր ներկայացնում այդ նյարդափոխադրիչ ամինաթթուների և դրանց նախորդող ամիդների փոխարկումների համեմատական ուսումնասիրությունը ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում: Քանի որ բազմաթիվ աղբյուրներից առաջացող ասպարագինաթթվի β-դեկարբոքսիլացման արդյունքում առաջանում է ԳԱԿԹ-ի հոմոլոգ β-ալանին, որը տրանսամինացվում է նաև ԳԱԿԹ-Տ-ի կողմից [Daniel et al., 2001] և ԳԱԿԹ-ի նման մասնակցում է նյարդափոխադրիչ գործընթացներում ինչպես ուղեղում, այնպես էլ ենթաստամոքսային գեղձում, նպատակահարմար էր համեմատել ամիդների փոխարկումները այդ օրգաններում:

Աղյուսակ 1-ի տվյալներից երևում է, որ ասպարագինի ինկուբացումը նշված պայմաններում բերում է ԳՆ-ի զգալի քանակի առաջացման 1.6 մկմոլ, այն դեպքում, երբ ԳԹ-ի առաջացումը կազմում է ընդամենը 0.1 մկմոլ (տող 2):

**Աղյուսակ 1**

Գլխուղեղի հոմոգենատում նյարդաակտիվ ամինաթթուների և ամոնիակի քանակները ասպարագինի ինկուբացման ժամանակ (մկմոլ/50մգ թարմ հյուսվածք, n=5, M ± SEM)

| | Նմուշ | ԳԹ | ԳՆ | ԱԹ | Ամոնիակ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **ԳԹ առանց ինկուբաց.(ստուգ.)** | 7.2±0.5 | չ.հ. | չ.հ. | 1.7±0.2 |
| 2 | **Ինկուբացում առանց հավելում.** | 0.1±0.02*** | 1.6±0.01* | 1.8±0.02 * | 1.5±0.2 |
| 3 | **Ինկուբացում + α-ԿԳ** | 0.3±0.03*** | 2.6±0,03** | 2.7±0,03** | 0±0*** |

* - $p < 0.05$; **- $p < 0.01$; ***- $p < 0.001$ ստուգիչի նկատմամբ; "չ.հ." -չի հայտնաբերվել

Ընդ որում ամոնիակի քանակը այս նմուշում գրեթե չի փոխվում (1.5 մկմոլ ստուգիչի 1.7 մկմոլի դիմաց) և նկատվում է ԱԹ-ի քանակի առաջացում մինչև 1.8 մկմոլ (տող 2): Նյութափոխանակության այսպիսի ուղղվածությունը անմիջապես չի վկայում, սակայն թույլ է տալիս ենթադրել, որ ԱՆ-ից ԳՆ է սինթեզվում: ԱՆ-ից ԳՆ սինթեզվելու գործընթացը ավելի արտահայտված է α-ԿԳ-ի առկայությամբ ինկուբացման պայմաններում (տող 3), երբ առաջանում են ԳՆ և ԱԹ մինչև 2,6 մկմոլ և 2,7 մկմոլ, համապատասխանաբար, իսկ ԳԹ-ի քանակը կազմում է ընդամենը 0.3 մկմոլ: Կարելի է ենթադրել, որ գլուտամինը այս դեպքում առաջանում է ասպարագինի

և α-կետոգլուտարաթթվի հետ տրանսամինացման ու գլուտամինաթթվի հետագա ռեամիդացման ճանապարհներով: Այս փորձում գրանցվում է էնդոգեն ամոնիակի լրիվ յուրացում (տող 3): ԱՆ պարունակող զուգահեռ փորձերում ավելացված ԱԵՖ-ի և *α*-ԿԳ-ի առկայությամբ դիտվել է էկզոգեն ԳԹ-ի յուրացման ճնշում:

Գլխուղեղի միտոքոնդրիումների դեպքում ԱՆ-ի հետ ինկուբացման արդյունքները մի փոքր այլ են (աղյուսակ 2):

**Աղյուսակ 2**

Գլխուղեղի միտոքոնդրիումներում ասպարագինից առաջացած գլուտամինաթթվի և ամոնիակի քանակները (մկմոլ/50մգ թարմ հյուսվածք, n=5, M ± SEM)

| | ԱՆ + հավելում | ԳԹ | Ամոնիակ |
|---|---|---|---|
| 1 | **ԳԹ առանց ինկուբացման (ստուգ.)** | 8.5±0.6 | 0.17±0.02 |
| 2 | **Ինկուբացում առանց հավելումների** | 2.0±0,03 | 0.17±0.03 |
| 3 | **ԳԹ** | 7.2±0.5* | 0.68±0.04*** |
| 4 | **ԳԹ+ ԱԵՖ** | 6.0±0.4* | 1.15±0.22*** |
| 5 | ***α*-ԿԳ** | 0.2±0.04*** | 0.44±0.05** |
| 6 | ***α*-ԿԳ +ԱԵՖ** | 0.5±0.04*** | 0.85±0.09*** |
| 7 | **ԳԹ+ *α*-ԿԳ** | 8.6±0.9 | 0.34±0.05* |
| 8 | **ԳԹ+ *α*-ԿԳ +ԱԵՖ** | 9.7±1.1 | 0.34±0.04* |

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ ստուգիչի նկատմամբ

ԳԹ-ի առկայությունը միջավայրում բերում է ամոնիակի քանակի քառապատիկ աճի, գլուտամինաթթվի քանակի հավաստի նվազման պայմաններում. ԳԹ-ի քանակը ստուգիչի 8.5 մկմոլ-ից իջնում է 7.2 մկմոլ, իսկ ամոնիակի քանակը 0.17 մկմոլ-ից աճում է մինչև 0.68 մկմոլ (տող 3): ԱԵՖ-ը խթանում է ԳԹ-ի յուրացումը և ամոնիակի առաջացումը, ինչը կարելի է համարել ԱՆ-ից և ԳԹ-ից ԳՆ-ի հնարավոր առաջացման և հետագա դեզամիդացման հետևանք (տող 4): α-ԿԳ առանձին և հատկապես ԱԵՖ-ի առկայությամբ նպաստում է ամոնիակի առաջացմանը, նվազեցնելով ԳԹ-ի քանակը (տող 5 և 6): Հետաքրքրական է, որ ինկուբացման միջավայրում բոլոր բաղադրիչների առկայության դեպքում նկատվում է ԳԹ-ի մակարդակի վիճակագրորեն ոչ հավաստի բարձրացում (տող 8):

Ենթադրվում է, որ միտոքոնդրիումներում կարող է ԱՆ-ից առաջանալ ԳՆ, և այս գործընթացի ընթացքին կարելի է հետևել ԳԹ-ի և ամոնիակի քանակական փոփոխությամբ: Ստացված տվյալները վկայում են գլխուղեղի հոմոգենատներում և միտոքոնդրիումներում նյարդաակտիվ ամինաթթուների նյութափոխանակության տարբերությունների մասին, ինչը կապված է ոչ միայն դրանց մետաբոլիզմի նեյրոգլիալ, այլ նաև ներբջջային կոմպարտմենտալիզացիայի հետ: Ստացված տվյալները խոսում են նաև ԱՆ-ից ԳՆ-ի սինթեզի հնարավորության մասին:

Աղյուսակ 3-ում ներկայացված են ենթաստամոքսային գեղձի հոմոգենատում ասպարագինի ինկուբացման արդյունքում ամոնիակի և ամինաթթուների քանակները: Հետաքրքիր է, որ այս աղյուսակի արդյունքները նման են վերևում

բերված առնետի գլխուղեղի արդյունքներին (աղյուսակ 1): Ստացված տվյալները վկայում են նյարդաակտիվ ամինաթթուների և դրանց ամիդների փոխանակության նմանության մասին՝ նյարդային հյուսվածքի և ենթաստամոքսային գեղձի բջիջներում: ԱԵՖ-ի ավելացումը ԳԹ և α-ԿԳ պարունակող նմուշին արգելակում է ամոնիակի կոնցենտրացիայի բարձրացումը:

**Աղյուսակ 3**

Ենթաստամոքսային գեղձի հոմոգենատում նյարդաակտիվ ամինաթթուների և ամոնիակի քանակները ասպարագինի ինկուբացման ժամանակ (մկմոլ/50մգ թարմ հյուսվածք, n=5, M ± SEM,)

| | Նմուշ | ԳԹ | ԳՆ | ԱԹ | Ամոնիակ |
|---|---|---|---|---|---|
| 1 | **ԳԹ առանց ինկուբաց. (ստուգ.)** | 9.8±1.1 | չ.հ | չ.հ | 0.9±0.08 |
| 2 | **Ինկուբ. առանց հավելումների** | 0.1±0.02*** | 1.5±0.02* | 2.1±0.02* | 0.9±0.03 |
| 3 | **α-ԿԳ** | 0.5±0.04*** | 2.1±0.07** | 2.2±0.3* | 0.08±0.01*** |
| 4 | **ԳԹ+ԱԵՖ** | 8.9±0.8 | 2.3±0.3** | չ.հ | 0.7±0.08 |

* - $p < 0.05$; **- $p < 0.01$; ***- $p < 0.001$ ստուգիչի նկատմամբ; "չ.հ." - չի հայտնաբերվել

Աղյուսակ 4-ում ներկայացված տվյալները ցույց են տալիս, որ ենթաստամոքսային գեղձի միտոքոնդրիումները պարունակում են ՖԱԳ, որը ակտիվանում է ոչ միայն ԱԵՖ-ով այլ նաև α-ԿԳ-ով: Ենթաստամոքսային գեղձի հոմոգենատի ինկուբացիան ԱՆ-ի հետ ԱԵՖ-ի կամ α-ԿԳ-ի առկայությամբ ուղեկցվում է ԳՆ-ի մակարդակի հավաստի բարձրացմամբ: Ստացված տվյալները խոսում են առնետի ուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում ԱՆ-ից ԳՆ-ի առաջացման հնարավորության մասին:

**Աղյուսակ 4**

Ենթաստամոքսային գեղձի միտոքոնդրիալ ֆրակցիայում նյարդաակտիվ ամինաթթուների և ամոնիակի քանակները գլուտամինի առկայությամբ ինկուբացման ժամանակ (մկմոլ/50մգ թարմ հյուսվածք, M ± SEM, n=5)

| Նմուշ | ԳՆ | ԳԹ | ԱԹ | ԳԱԿԹ | Ամոնիակ |
|---|---|---|---|---|---|
| **Առանց ինկուբաց.(ստ.)** | 10.1±0.7 | 0.7±0.08 | 0.25±0.03 | 0.18±0.02 | 0.6±0.04 |
| **Առանց հավելումների** | 9.5±1.0 | 0.9±0.1 | 0.35±0.05 | 0.25±0.04* | 0.9±0.1* |
| **$NaH_2PO_4$** | 7.1±0.5* | 1.65±0.2** | 0.35±0.03 | 0.25±0.06 | 1.8±0.2** |
| **ԱԵՖ** | 8.6±0.6 | 1.25±0.15* | 0.55±0.05* | 0.2±0.02 | 1.75±0.2** |
| **ԳԹ** | 9.2±0.8 | 7.9±0.9 | 1.1±0.2*** | 0.38±0.03** | 1.1±0.2 |
| **α- ԿԳ** | 7.8±0.8* | 1.5±0.2* | 0.45±0.05* | 0.19±0.02 | 0.95±0.1 |

* - $p < 0.05$; **- $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$ ստուգիչի նկատմամբ

Հաջորդ փուլում, մեր կողմից ուսումնասիրվեց նյարդաակտիվ ամինաթթուների քանակը առնետների ենթաստամոքսային գեղձում: Ինչպես երևում է աղյուսակ 5-ից ենթաստամոքսային գեղձը պարունակում է ուղեղի հետ համեմատելի նյարդաակտիվ ամինաթթուների քանակներ. էթանոլ ամին, որը ինչպես և ԳԱԿԹ-ը նպաստում է կենսաբանական թաղանթներով գլյուկոզի թափանցելիությանը [Мовсесян, 1961]: Բացառված չէ էթանոլամինի սուլֆատացումը օրգանիզմում ԳԱԿԹ-տրանսամինազի արգելակիչ ԷՕՍ-ի առաջացմամբ [Камалян, 1985]:

**Աղյուսակ 5**

Առնետի ենթաստամոքսային գեղձում նյարդաակտիվ ամինաթթուների մակարդակները (մկմոլ/50մգ թարմ հյուսվածք, M±SEM, n=5)

| ԳԹ | ԳԱԿԹ | ԳՆ | ԱԹ | ԷԱ |
|---|---|---|---|---|
| 4.1±0.03 | 0.98±0.06 | 4.6±0.2 | 1.3±0.15 | 0.68±0.08 |

Ելնելով գրականության այն տվյալներից, որ ԳԱԿԹ-ը դրսևորում է հակաբորբոքային հատկություններ և կարող է օգտակար լինել β-բջիջների աճակալման համար [Tian, 2004; Tian et al., 2014] և հաշվի առնելով ենթաստամոքսային գեղձում ԳԱԿԹ-ի և նրա մետաբոլիզմի ֆերմենտների տարածվածությունը [Baekkeskov et al., 1990; Sorensen et al., 1991; Michalik et al., 1993; Adeghate and Ponery, 2002; Park et al., 2006; Tian et al., 2014, Wang, Wang, 2015], դրանց դերը գեղձի ֆունկցիաներում, առանձին շարքի փորձերում հետազոտվել է գլխուղեղի, լյարդի և ենթաստամոքսային գեղձի ամինաթթուների քանակական փոփոխությունների վրա ԳԱԿԹ-տրանսամինազի արգելակիչ՝ էթանոլամին-O-սուլֆատի և ԳԱԿԹ-ի նախանյութ՝ գլուտամինի համատեղ նախնական ներարկման ազդեցությունը ստրեպտոզոտոցինային շաքարախտի դեպքում:

Կենդանիները բաժանվել են 3 խմբերի. առաջին խումբը՝ ինտակտ ստուգիչ, երկրորդ խումբը օգտագործվել է որպես փորձարարական ստրեպտոզոտոցինային շաքարախտի ստուգիչ (3 օր ներարկվել է 1 մլ 0,9% ֆիզիոլոգիական լուծույթ), երրորդ խմբի կենդանիներին 3 օր ներարկվել է 1 մլ ԷՕՍ + ԳՆ խառնուրդը: Չորրորդ օրը երկրորդ և երրորդ խմբերի կենդանիներին ներարկվել է ստրեպտոզոտոցին: Ստրեպտոզոտոցին ներերկելուց 5 օր անց այն կենդանիները, որոնց մոտ գրանցվել է գլյուկոզի բարձր մակարդակ, (հիպերգլիկեմիա), գլխատվել են թույլ եթերային նարկոզի ազդեցության պայմաններում: Նշենք, որ ուսումնասիրվող խառնուրդի ներարկումը նախքան ստրեպտոզոտոցինով շաքարախտի խթանումը նպաստել է այս մոդելում գլյուկոզի ավելի ցածր մակարդակի ի հայտ գալուն:

Աղյուսակ 6-ում ներկայացված տվյալները վկայում են ԳՆ+ԷՕՍ ներարկած կենդանիների մոտ 1,5 անգամ գլյուկոզի ավելի ցածր մակարդակ, քան ՍՍ ստուգիչ խմբում (23,7±1,9 մմոլ/լ-ի դիմաց 16,5±1,2 մմոլ/լ), չնայած ինտակտ առնետների համեմատ (6,7±0,5 մմոլ/լ) այն բարձր է 2,4 անգամ: Հնարավոր է, որ պրեպարատները ազդում են ոչ միայն ինսուլինի սինթեզի և արտազատման, այլ և գլյուկոզի յուրացման վրա:

**Աղյուսակ 6**

Ստրեպտոզոտոցինով խթանված փորձարարական շաքարախտի մոդելում գլուտամինի և էթանոլամին-O-սուլֆատի համատեղ ներարկման ազդեցությունը գլյուկոզի մակարդակի վրա (M±SEM, n=5)

| Գլյուկոզ, մմոլ/լ | Ստուգիչ | US | (ԳՆ + ԷՕՍ) +US |
|---|---|---|---|
| | 6.7±0.5 | 23.6±1.9*** | 16.5±1.2***/# |

***- p≤0,0001՝ ստուգիչի նկատմամբ; #- p=0.0112՝ US-ի նկատմամբ

Կենդանիների գլխուղեղում, ենթաստամոքսային գեղձում, լյարդում գնահատվել են նյարդաակտիվ ամինաթթուների մակարդակները: Աղյուսակ 7-ում ներկայացված են այս փորձի արդյունքում ստացված տվյալները:

**Աղյուսակ 7**

Առնետի հյուսվածքներում ԷՕՍ-ի և ԳՆ-ի համատեղ ներարկման ազդեցությունը նյարդաակտիվ ամինաթթուների մակարդակի վրա ստրեպտոզոտոցինային մոդելում (մկմոլ/50մգ թարմ հյուսվածք, M ± SEM, n=5)

| Կենդանիների խումբը | | Հյուսվածք | ԱԹ | ԳԹ | ԳՆ | ԳԱԿԹ | ԷԱ |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | Ստուգիչ | Ուղեղ | 3.9 ±0.4 | 8.5±0.9 | 4.5±0.4 | 4.5±0.4 | 2.3±0.4 |
| 2 | | Լյարդ | 2.9±0.4 | 2.0±0.3 | 3.2±0.3 | 0.13±0.02 | 2.2±0.3 |
| 3 | | Ե/գ | 1.3±0.1 | 4.1±0.03 | 4.6±0.2 | 0.98±0.06 | 0.68±0.08 |
| 4 | US | Ուղեղ | 2.2±0.065* | 6.5±0.7* | 4.0±1.0 | 1.7±0.1** | 1.45±0.25* |
| 5 | | Լյարդ | 2.0±0.18* | 1.4±0.3* | 2.4±0.36* | 0.4±0.07** | 1.05±0.06* |
| 6 | | Ե/գ | 1.2±0.1 | 2.1±0.2* | 3.1±0.4* | 0.7±0.1* | 0.63±0.1 |
| 7 | ԷՕՍ+ԳՆ +US | Ուղեղ | 2.6±0.3 | 8.0±0.6# | 6.5±0.4# | 3.2±0.5# | 2.3±0.3 |
| 8 | | Լյարդ | 2.9±0.2 | 1.6±0.25 | 3.9±0.3 | 0.65±0.1## | 1.2±0.2 |
| 9 | | Ե/գ | 1.4±0.2 | 4.6±0.7## | 7.1±0.9## | 1.2±0.2# | 1.1±0.2# |

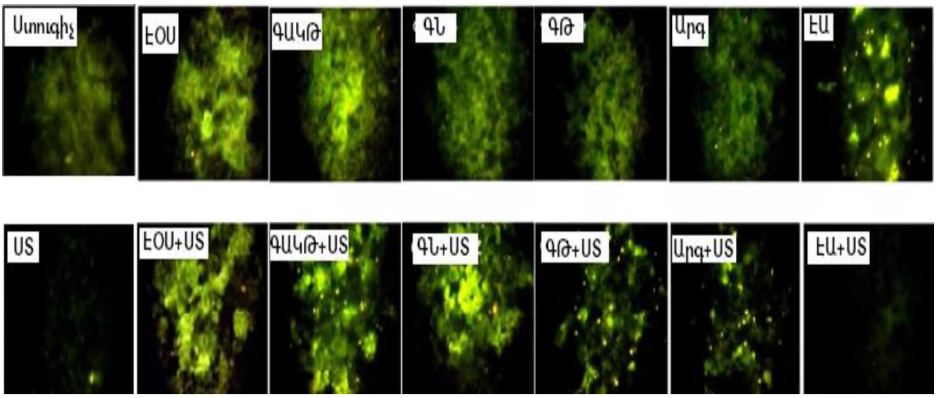
* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$ ստուգիչի նկատմամբ; #- $p < 0.05$; ##- $p < 0.01$ US խմբի նկատմամբ

Աղյուսակ 7-ի տվյալներից երևում է, որ US-ի ազդեցության ներքո առնետի օրգաններում տեղի է ունենում երկկարբոն ամինաթթուների վիճակագրորեն հավաստի նվազում, ԳԱԿԹ-ը (4,5 մկմոլ-ից 1,7 մկմոլ գլխուղեղում, 0,98 մկմոլ-ից 0,7 մկմոլ ե/գ-ում): Ստացված տվյալները վկայում են, որ ԷՕՍ-ի և ԳՆ-ի համատեղ ներարկումը նպաստում է ամինաթթուների քանակների պահպանմանը, մասնավորապես ԳԱԿԹ-ը գլխուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում, որտեղ վերջինս հիմնականում ներկայացված է Լանգերհանսյան կղզյակների β-բջիջներում, որոնցում ԳԱԿԹ-ը և գլյուկոզը նպաստում են ինսուլինի սինթեզին և արտազատմանը:

Այսպիսով, ԳԱԿԹ-ի քանակը ենթաստամոքսային գեղձում դիաբետոգեն ՍՏ-ի խմբում կազմում է 0,7 մկմոլ, իսկ ԷՕՍ-ի և ԳՆ-ի համատեղ ներարկված խմբում 1,2 մկմոլ: ԳՆ-ի քանակը 2,3 անգամ, իսկ ԳԹ-ը 2,2 անգամ գերազանցում է ստրեպտոզոտոցինային խմբի մակարդակը:

Ուսումնասիրված նյութերի ազդեցությունը փորձարարական շաքարախտի մոդելի վրա հաստատվում է նաև նրանց և ամինաթթուների ազդեցությամբ ինսուլինի ֆլյուորեսցիենցիայի վրա ենթաստամոքսային գեղձի β-բջիջների կուլտուրայում:

Փորձերի ժամանակ մկների β-բջիջների կուլտուրայի վրա ավելացվել են առանձին ամինաթթուներ և կուլտուրայի միջավայրում հետազոտվել է ամինաթթուների ազդեցությունը β-բջիջներում ֆլուորեսցենտային նիշ՝ ՖԻԹՑ-ի հետ կապված ինսուլինի մակարդակի վրա ՍՏ-ի բացակայության և ներկայության պայմաններում: Ըստ նկար 1-ում ներկայացրած պատկերի, ստուգիչ (նատիվ) խմբում առկա են որոշակի քանակով ինսուլին արտադրող բջիջներ: ՍՏ ավելացված ստուգիչ նմուշում դրանց թիվը կտրուկ նվազում է: β-բջիջների կուլտուրային ԷՕՍ-ի, ԳԱԿԹ-ի և ԳՆ-ի ավելացումը ակնհայտ ավելացնում է ինսուլին արտադրող բջիջների քանակը: Այդ գործընթացը ավելի արտահայտված է ԷՕՍ-ի ավելացման, համեմատաբար փոքր չափով նաև ԳՆ-ի, ԳԹ-ի, արգինինի և էթանոլամինի ավելացման դեպքերում:

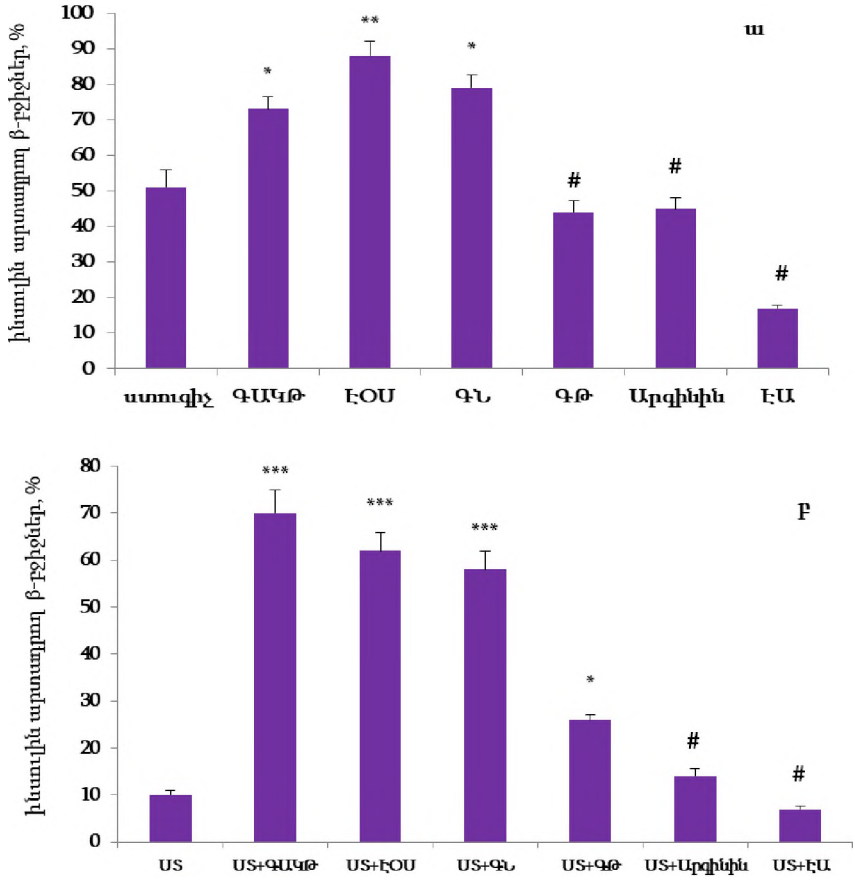



Նկ.1. Նատիվ և ստրեպտոզոտոցին պարունակող β-բջջային կուլտուրաներում ինսուլին արտադրող բջիջների մակարդակը ըստ ՖԻԹՑ-ի ֆլյուորեսցենցիայի

Հետաքրքիր է, որ ՍՏ-ի առկայությամբ ինսուլին արտադրող բջիջների քանակը մնում է գրեթե անփոփոխ ԳԱԿԹ և ԷՕՍ ավելացված նմուշներում, իսկ ԳՆ-ի դեպքում այն նույնիսկ աճում է: Ինչպես ստուգիչ, այնպես էլ ՍՏ պարունակող կուլտուրաներում ինսուլինի մակարդակի բարձրացմանը օգտագործած նյութերից ամենաարտահայտված ազդեցությունն ունի ԷՕՍ-ը: Դրան հաջորդում են ԳՆ, ԳԱԿԹ և ԳԹ: ՍՏ չպարունակող կուլտուրաներում ԷՕՍ-ը խթանում է ինսուլինի բարձրացում ստուգիչի նկատմամբ 1.7 անգամ, իսկ ԳՆ, ԳԱԿԹ-ն և ԳԹ 1.5; 1.4 և 1.6 անգամ, համապատասխանորեն: Հարկ է նշել, որ ուսումնասիրվել է նյութերի միայն

մեկ կոնցենտրացիա (10մկգ/մլ): Հնարավոր է նաև ազդեցության չափաբաժին-կախվածություն:

Նկար 2-ում ներկայացված են US-ի բացակայության և ներկայության պայմաններում ինսուլին արտադրող β-բջիջների քանակները որպես բջիջների ընդանուր քանակի տոկոս: Ակնհայտ է, որ US ավելացված ստուգիչ նմուշում (բ) դրանց թիվը շուրջ 5 անգամ ցածր է ստուգիչ (նատիվ) խմբի (ա) համեմատ:




Նկար 2. ինսուլին արտադրող β-բջիջների քանակները որպես բջիջների ընդանուր քանակի տոկոս նշված ամինաթթուների առկայությամբ US չպարունակող ա) և US պարունակող (բ) նմուշներում: (M ± SEM, n = 5); * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$; # $p > 0.05$

Ալոքսանը, ի տարբերություն ՍՏ-ի, արգելակում է ենթաստամոքսային գեղձի կղզյակային բջիջների գլուկոկինազը, այսինքն ինսուլինի սինթեզի և արտազատման վրա գլյուկոզի ազդեցության հիմնական ազդակային ուղին, հնարավոր է, որ ԷՕՍ-ը պահպանում է գլուկոկինազի ակտիվ կենտրոնի SH-խմբերը ալոքսանի օքսիդացնող ազդեցությունից: Դրա հետ միասին ԷՕՍ-ը բարձրացնելով ԳԱԿԹ-ի քանակը ենթաստամոքսային գեղձում և ուղեղում, հավանաբար ինչպես ԳԱԿԹ-ի միջոցով, այնպես էլ ինքնուրույն, արգելակելով աուտոիմունային ռեակցիայի բորբոքային բաղադրիչը՝ խթանում է հակաբորբոքային T-կարգավորիչ բջջային պատասխանները: Հաջորդ շարքի փորձերում հետազոտվել է ԷՕՍ-ի նախնական ներարկման ազդեցությունը առնետի արյան գլյուկոզի մակարդակի և հյուսվածքներում նյարդաակտիվ ամինաթթուների քանակական փոփոխությունների վրա ալոքսանով խթանված շաքարախտի դեպքում:

Աղյուսակ 8-ում ներկայացված արյան գլյուկոզի մակարդակները ցույց են տալիս, որ առնետներին ԷՕՍ-ի նախապես ներորովայնային ներարկումը կանխում է ալոքսանի հիպերգլիկեմիկ ազդեցությունը՝ նորմալացնելով արյան գլյուկոզի մակարդակը:

**Աղյուսակ 8**

Ալոքսանով խթանված շաքարախտով հիվանդ առնետների արյան գլյուկոզի մակարդակի վրա ԷՕՍ-ի նախնական ներարկման ազդեցությունը (M ± SEM, n = 8)

| | **Ստուգիչ** | **Ալոքսան** | **ԷՕՍ + Ալոքսան** |
|---|---|---|---|
| **Գլյուկոզ, մմոլ/լ** | 6.5 ±0.2 | 24,9 ± 3,1 *** | 6,9±0,8$^{\#\#\#/\&}$ |

***- p ≤0,0001՝ ստուգիչի նկատմամբ; ### p ≤ 0,0001՝ ալոքսանի նկատմամբ;
&- p = 0.045՝ ստուգիչի նկատմամբ

Ներկայացված տվյալներից երևում է, որ ենթաստամոքսային գեղձը պարունակում է գրեթե հավասար քանակությամբ ԱԹ և ԳԱԿԹ (1.7մկմոլ և 1.5 մկմոլ), ԳԹ և ԳՆ (4.1մկմոլ և 3.8 մկմոլ): Ալոքսանի ներորովայնային ներարկումը բերում է, ի տարբերություն ստրեպտոզոտոցինի, երկկարբոն ամինաթթուների և ԳՆ-ի քանակների վիճակագրորեն հավաստի բարձրացմանը՝ չթողնելով էական ազդեցություն ԳԱԿԹ-ի քանակի վրա: Ալոքսանի ներարկումը ԷՕՍ-ի եռօրյա (0.5 գ/կգ) ներարկումից հետո վերականգնում է ԳՆ-ի և ԳԹ-ի սկզբնական քանակները և միաժամանակ խիստ բարձրացնում է ԳԱԿԹ-ի մակարդակը ենթաստամոքսային գեղձում: Պետք է նշել, որ ԷՕՍ-ը ազդում է ոչ միայն ԳԱԿԹ-Տ-ի, այլ նաև գլուտամատդեկարբօքսիլազի, թիրոզինհիդրօքսիլազի ակտիվության, այսինքն կատեխոլամինների սինթեզի, ինչպես և գլյուկոզի թաղանթներով թափանցելիության վրա:

Աղյուսակ 7-ի և 9-ի տվյալների համեմատությունը ցույց է տալիս որոշակի տարբերություններ ՍՏ-ի և ալոքսանի ազդեցությամբ ամինաթթուների մակարդակի վրա: Այն դեպքում, երբ ՍՏ-ը իջեցնում է ԳՆ-ի, ԳԹ-ի և ԳԱԿԹ-ի քանակները

ենթաստամոքսային գեղձում, ալոքսանը բարձրացնում է ԳՆ-ի և ԳԹ-ի քանակը՝ չազդելով ԳԱԿԹ-ի պարունակության վրա, հավանական է դա պայմանավորված է երկու դիաբետոգենների ցիտոտոքսիկ ազդեցության մեխանիզմների տարբերությամբ [Zskudelski, 2001; Lenzen, 2008]:

**Աղյուսակ 9**

ԷՕՍ-ի ազդեցությունը ալոքսանով խթանված շաքարախտի դեպքում առնետների ենթաստամոքսային գեղձի ամինաթթուների պարունակության վրա (մկմոլ/50մգ թարմ հյուսվածք/ M ± SEM, n=5)

| Ամինաթթուներ | ԱԹ | ԳԹ | ԳՆ | ԳԱԿԹ |
|---|---|---|---|---|
| **Ստուգիչ** | 1.7±0.4 | 4.1±0.8 | 3.8±0.3 | 1.5±0.3 |
| **Ալոքսան** | 2.6±0.4* | 6.2±0.6* | 6.9±0.6* | 1.2±0.2 |
| **ԷՕՍ + ալոքսան** | 3.1±0.7 | 3.6±0.3# | 3.9±0.8# | 3.4±0.8## |

* - $p < 0.05$ ստուգիչի նկատմամբ; # - $p < 0.05$; ## - $p < 0.01$ ալոքսանի նկատմամբ

Ալոքսանը արգելակում է գլյուկոկինազը և, հավանաբար, բերում է էներգիայի այլ աղբյուրների հայթայթման, այդ թվում ամինաթթուների յուրացմանը, ինչը սկզբնական շրջանում հավանաբար նպաստում է ինսուլինի սինթեզին ու արտազատմանը և անդրադառնում գլյուկոզի մակարդակի վրա: Ալոքսանի ներարկումը ԳԱԿԹ-Տ-ի արգելակիչ ԷՕՍ-ից հետո չի ազդում ԳՆ-ի և ԳԹ-ի պարունակության վրա, որոնք հանդիսանում են ԳԱԿԹ-ի աղբյուր: Վերջինիս մակարդակը համեմատած ինչպես ստուգիչ, այնպես էլ ալոքսանային շաքարախտով հիվանդ խմբի առնետների հետ, բարձրանում է 2.3 - 2.8 անգամ: Նման ազդեցությունը վկայում է ԷՕՍ-ի հնարավոր հակաշաքարախտային ակտիվության մասին, քանի որ այդպիսի ակտիվություն է վերագրվում ԳԱԿԹ-ին [Tian et al., 2014]: Բացառված չէ ԷՕՍ-ի նաև ինքնուրյուն ազդեցությունը գլյուկոզի յուրացման և ինսուլինի սինթեզի մեխանիզմների վրա: Ըստ որոշ տվյալների ԷՕՍ-ը կարող է բացի ԳԱԿԹ-ի արգելակումից նաև ակտիվացնել գլուտամատդեկարբոքսիլազը [Losher,1980], ազդել կատեխոլամինների սինթեզի, գլյուկոզի ներծծման և կենսաբանական թաղանթների ֆոսֆոլիպիդային բաղադրության վրա:

**Աղյուսակ 10**

ԷՕՍ-ի ազդեցությունը ալոքսանով խթանված շաքարախտով հիվանդ առնետների գլխուղեղի ամինաթթուների պարունակության վրա (մկմոլ /50 մգ թարմ հյուսվածք M ± SEM, n=5)

| Ամինաթթուներ | ԱԹ | ԳԹ | ԳՆ | ԳԱԿԹ |
|---|---|---|---|---|
| **Ստուգիչ** | 2.0±0.2 | 3.9±0.8 | 3.2±0.6 | 1.6±0.4 |
| **Ալոքսան** | 2.2±0.2 | 4.4±0.5 | 3.3±0.4 | 1.6±0.3 |
| **ԷՕՍ +ալոքսան** | 2.0±0.3 | 4.1±0.6 | 3.3±0.7 | 3.2±0.5 ** |

** - $p < 0.05$ ստուգիչի և ալոքսանի նկատմամբ

Գլխուղեղում ալոքսանի ներարկումից հետո նյադաակտիվ ամինաթթուների պարունակությունը մնում է գրեթե անփոփոխ: Ալոքսանի ներարկումը ԷՕՍ-ի եռօրյա ներարկումից հետո անդրադառնում է միայն ԳԱԿԹ-ի քանակության վրա, որը 2 անգամ բարձր է, քան ինտակտ կամ միայն ալոքսանով խթանված շաքարախտով հիվանդ առնետների խմբում:

Հավանական է, որ ալոքսանը չի հաղթահարում արյուն-ուղեղային պատնեշը: ԳԱԿԹ-ի քանակի ավելացումը ուղեղում նախ և առաջ նպաստում է ԳԱԿԹ-էրգիկ մեխանիզմների գործունեության բարելավմանը: Բացի այդ հայտնի է, որ ուղեղի ԳԱԿԹ-էրգիկ մեխանիզմները մասնակցում են արյան գլյուկոզի հոմեոսթազի պահպանման գործընթացներում [Lang, 1995] և հետևաբար ազդում են ենթաստամոքսային գեղձի աշխատանքի վրա:

## ԵԶՐԱԿԱՑՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ

1. Պարզվել է, որ առնետների գլխուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում ասպարագինը հանդիսանում է ԳԱԿԹ-ի նախորդ՝ գլուտամինի աղբյուր:
2. Հաստատվել է գլխուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում նյարդաակտիվ ամինաթթուների քանակության և նյութափոխանակության (ասպարագինի և գլուտամինի յուրացման) համանմանությունը և միտոքոնդրիումներում ֆոսֆատակտիվացվող գլուտամինազի առկայությունը:
3. Ստրեպտոզոտոցինով առաջացրած հիպերգլիկեմիան ուղեկցվում է առնետի գլխուղեղում և ենթաստամոքսային գեղձում ԳՆ-ի, ԳԹ-ի, ԳԱԿԹ-ի մակարդակների նվազեցմամբ: ԷՕՍ-ի նախնական ներարկումը կանխարգելում է նշված ազդեցությունները:
4. Ալոքսանով առաջացրած հիպերգլիկեմիան ուղեկցվում է առնետի ենթաստամոքսային գեղձում ԳՆ-ի, ԳԹ-ի մակարդակների բարձրացմամբ: ԷՕՍ-ի նախնական ներարկումը կանխարգելում է այդ ազդեցությունները և բարձրացնում ԳԱԿԹ-ի մակարդակը ենթաստամոքսային գեղձում ու գլխուղեղում:
5. β-բջիջների կուլտուրայում էթանոլամին-O-սուլֆատը, ԳԱԿԹ-ը և ԳՆ-ը դրսևորում են ինսուլինոգեն հատկություն ինչպես նորմայում, այնպես էլ ստրեպտոզոտոցինի առկայությամբ:
6. Ստացված տվյալները վկայում են, որ ԳԱԿԹ-ի նախորդ՝ գլուտամինը, ինչպես և կլինիկայում այլ նպատակներով օգտագործվող ԳԱԿԹ-ի ագոնիստներն ու ԳԱԿԹ-Տ-ի արգելակիչները կարող են հանդիսանալ շաքարախտի բուժման միջոցներ:

## ՀՐԱՏԱՐԱԿՈՒՄՆԵՐԻ ՑԱՆԿ

**Հոդվածներ**

1. Камалян Р.Г.,Варданян А.Г.,Хачатрян Н.Х., Григорян А.Г. Некоторые особенности обмена дикорбоновых аминокислот в мозге крысы. // Доклады НАН РА, 2013, 113(1), с.59-64.

2. R.G. Kamalyan, N.Kh. Khachatryan., A.G.Vardanyan, S.Q. Taroyan, L.N.Eritsyan. The influence of glutamine and ethanolamine-O-sulfate on neuroactive amino acids content in the rat organs in norm and with experimental streptozotocine diabetes. // Biolog. Journal of Armenia, 2015, 67(3), p.61-66.
3. Камалян Р.Г., Арутюнян А.А., Хачатрян Н.Х., Варданян А.Г., Тароян С.Г. Влияние ГАМК-генерирующих факторов на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. // Медицинская наука Армении НАН РА, 2015, 55(4), с.32-42.
4. Н.Х. Хачатрян, А.Г Варданян, С.Г. Тароян, Р.С. Хачатрян, Р.Г Камалян. Влияние этаноламин-О-сульфата на содержание нейроактивных аминокислот в органах крыс в норме и при экспериментальном аллоксановом диабете. // Биолог. Журн. Армении, 2017, 69(1), с.68-72.
5. Хачатрян Н.Х. Пути обмена амидов в поджелудочной железе. // Биолог. Журн. Армении, 2019, 71(2), с.62-65.
6. Хачатрян Н.Х. Сравнительное действие диабетогенов на садержание нейроактивных аминокислот в мозге и поджелудочной железе крыс. // Медицинская наука Армении НАН РА, 2020, 60(2), с.38-44.

**Գիտաժողովներում տպագրված նյութեր**

1. Хачатрян Н.Х. К обмену аспарагина в тканевых препаратах мозга крысы. Сборник статей (часть 2) VI Международной научной конференции Инновационное Развитие и Востребованность Науки в Современном Козахстане, Алмааты, 2012, ст. 99-102.
2. Khachatryan N.Kh., Vardanyan A.G., Kamalyan R.G. To Metabolizm of transmitter amino acids in rat brain. AAB Young scientists Conference. New aspects in molecular biotechnology and biochemistry. Yerevan, RA, 2013, June 27-28, p. 25.
3. Taroyan S.Q., Khachatryan N.Kh., Khachatryan H.S., The prpotective effect of ethanolamine-O-sulphate in experimental diabetes mellitus. Abstracts of The Internatiomal Young Scientists Conference. "New trends in life science". Yerevan Armenia, 2016, 26-28 September, p. 68.
4. Тароян С.Г., Хачатрян Р.С., Хачатрян Н.Х., Варданян А.Г., Камалян Р.Г. К обмену нейроактивных аминокислот в митохондриях мозга и панкреаса в норме и при экспериментальном стрептозотоциновом диабете. Международная конференция молодых ученых “Прошлое, настаящее и будущее биохимии” посвященная 110-летию акдемикоса Г. Бунятяна, Ереван. 2017, ст. 57-65.
5. Хачатрян Р.С., Хачатрян Н.Х., Камалян Р.Г. Антидиабетогенное действие комплекса нейроактивных аминокислот на модели аллоксаного диабета. Международная конференция «Современные тенденции биохимии, радиационной и космической биологии: Великий Сисакян и занчение его исследований». Ереване., 11-13 ноябрь 2019. ст. 85-88.

ХАЧАТРЯН НАРИНЕ ХАЧИКОВНА

# КОЛИЧЕСТВЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ НЕЙРОАКТИВНЫХ АМИНОКИСЛОТ В МОЗГУ И ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЕ КРЫС В НОРМЕ И ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

## РЕЗЮМЕ

**Ключевые слова**: нейроактивные аминокислоты, этаноламин-О-сульфат, глутамин,глюкоза, мозг, панкреас, диабет

В работе проведено сравнительное изучение содержания и обмена нейроактивных аминокислот в мозге и поджелудочной железе. В частности изучена утилизация их амидов как возможных источников ГАМК, играющей важную роль не только в деятельности мозга, но и в эндокринной и экзокринной функциях панкреаса. Подтверждено сходство в количественном распределении и метаболизме нейроактивных аминокислот в обоих органах, наличие высокоактивной фосфатакивируемой глутаминазы в митохондриальной фракции поджелудочной железы, показан аналогичный характер генерации ГАМК из глутамина при подавлении ГАМК-трансаминазы (ГАМК-Т) ее специфическим ингибитором этаноламин-О-сульфатом (ЭОС). Показано, что аспарагин как в мозге, так и в поджелудочной железе может быть возможным источником глутамина, а следовательно ГАМК. α-кетоглутарат в гомогенатах мозга усиливает выход глутамина и аспартата при инкубации с аспарагином. Добавление в инкубационную среду глутамата снимает подобный эффект α-кетоглутарата при одновременном усилении выхода аммиака. В гомогенатах поджелудочной железы α-кетоглутарат также вызывает повышение выхода глутамина и глутамата, но без влияния на уровень аспартата. Подтверждено ГАМК генерирующее действие как отдельного введения ЭОС и глутамина, так и в особенности их совместного внутрибрюшинного введения.

Исходя из данных о стимулирующем действии ГАМК на пролиферацию β-клеток, синтез и высвобождение инсулина, а также противовоспалительных, трофических и иммуномодуляторных свойств этой аминокислоты нами было исследовано влияние предварительного введения ГАМК-генерирующих

соединений, глутамина и ЭОС, на содержание и метаболизм нейроактивных аминокислот в мозге и поджелудочной железе и уровень глюкозы в крови интактных и подвергнутых воздействию диабетогенов (стрептозотоцин и аллоксан) крыс. Показано более эффективное ГАМК-генерирующее действие предварительного совместного введения глутамина и ЭОС, вызывающего также заметное подавление гипергликемического эффекта стрептозотоцина. Преимущество использования глутамина и ЭОС вместо ГАМК заключается в преодолении ими гемато-энцефалического барьера и активации ГАМК эргических систем мозга, участвующих в регуляции содержания глюкозы в крови. Выявлены существенные различия в эффектах стрептозотоцина и аллоксана на содержание нейроактивных аминокислот в мозге и панкреасе крыс. Так, стрептозотоцин вызывает статистически значимое снижение концентрации нейроактивных аминокислот как в мозге, так и в поджелудочной железе, тогда как аллоксан, не влияя на их уровень в мозге, приводит к повышению концентрации глутамата и глутамина без существенного изменения уровня ГАМК в поджелудочной железе. Отсутствие эффекта алоксана на содержание нейроактивных аминокислот мозга, по-видимому, связано с непреодолимостью гемато-энцефалического барьера для этого диабетогена. Предварительное внутрибрюшинное трехдневное введение ЭОС и глутамина снимает эффекты стрептозотоцина и аллоксана на уровень нейроактивных аминокислот в органах крыс. Показана большая эффективность ЭОС в предупреждении гипергликемии, вызываемой аллоксаном, чем стрептозотоцином, что по-видимому связано с различиями в механизмах цитотоксического действия диабетогенов.

На культуре островковых β-клеток поджелудочной железы в опытах in vitro показано усиление флюоресценции ФИТС-меченого инсулина при добавлении ЭОС, ГАМК или глутамина, особенно выраженное в случае первого. Добавление стрептозотоцина к культуре островковых β-клеток поджелудочной железы вызывает резкое понижение уровня инсулина, которое компенсируется как ЭОС, так и ГАМК и глутамином. Полученные данные свидетельствуют о перспективности применения ГАМК-генерирующих агентов (глутамин, агонисты ГАМК, ингибиторы ГАМК-трансаминазы) в профилактике и лечении сахарного диабета.

KHACHATRYAN NARINE KHACHIK

QUANTITATIVE CHANGES OF NEUROACTIVE AMINO ACIDS IN THE BRAIN AND PANCREAS OF RATS IN THE CONDITIONS OF THE EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

SUMMARY

**Key words**: neuroactive amino acids, etanolamine-O-sulphate, glutamine, glucose, brain, pancreas, diabetes mellitus

GABA plays an important role not only in the brain activity but in endocrine and exocrine functions of the pancreas. In this work the comparative study of the metabolism of neuroactive amino acids in the brain and pancreas, in particular their amides as possible sources of GABA, was carried out. The similarities in the quantitative distribution and metabolism of neuroactive amino acids in both organs, the presence of highly active phosphate-activated glutaminase in the pancreas were confirmed, and a similar character of the GABA generation from glutamine was shown in the conditions of GABA-T inhibition.

It has been shown that asparagine can be a possible source of glutamine, consequently, for GABA as well, in both organs: brain and the pancreas. Alfa-ketoglutarate in the brain homogenates accelerates the output of glutamine and aspartate upon incubation with asparagine. Glutamate addition to the incubation medium removes that effect of α-ketoglutarate while enhancing the output of ammonia. In pancreatic homogenates, α-ketoglutarate also causes an increase in the yield of glutamine and glutamate, but without affecting the level of aspartate. It was confirmed the GABA generating effect in both conditions: separate administration of etanolamine-O-sulphate (EOS) and glutamine, and especially during their joint intraperitoneal injection to rats.

Based on the data about the stimulating effect of GABA on the proliferation of β-cells, synthesis and release of insulin, as well as the anti-inflammatory, trophic and immunomodulatory properties of this amino acid, we have studied the effect of the preliminary administration of GABA-generating compounds, glutamine and EOS on the content and metabolism of neuroactive amino acids in the brain and pancreas as well as blood glucose levels of intact and streptozotocin/alloxan injected, diabetes-induced rats.

It was shown more effective GABA-generating effect of preliminary joint administration of glutamine and EOS to rats, causing a marked suppression of the hyperglycemic effect of streptozotocin. The advantage of using glutamine and EOS instead of GABA is their ability to cross the blood-brain barrier and activate the GABAergic systems of the brain involved in the regulation of blood glucose level. It has been revealed the differences in the effects of streptozotocin and alloxan on the content of neuroactive amino acids in the rat's brain and pancreas. We have shown, streptozotocin causes a statistically significant decrease in the concentration of neuroactive amino acids both - in the brain and in the pancreas, whereas alloxan, without affecting their level in the brain, leads to an increase in the concentration of glutamate and glutamine and a decrease of GABA in the pancreas. The absence of the effect of aloxane on the content of neuroactive amino acids in the brain, apparently, is associated with the impermeability of the blood-brain barrier for this dibetogen. A preliminary intraperitoneal three-day administration of EOS and glutamine eliminate the effects of streptozotocin and alloxan on the level of neuroactive amino acids in the rat organs. EOS has been shown to be more effective in preventing alloxan- than streptozotocin-induced hyperglycemia, which is probably associated with the differences in the mechanisms of the cytotoxic effects of these diabetogens.

An increase in FITS-marked insulin fluorescence in the culture of pancreatic islet β-cells has been shown with the addition of EOS, GABA, or glutamine. We have found that these compounds compensate the streptozotocin-induced insulin lowering as well.

Obtained data indicate the promising use of GABA-generating agents (glutamine, GABA agonists, GABA-transaminase inhibitors) in the prevention and treatment of diabetes mellitus.